

综述

光遗传学作为肿瘤治疗的新策略

魏素云, 牟伟伟, 刘永军*, 张娜*

(山东大学药学院, 天然产物化学生物学教育部重点实验室, 济南 250012)

摘要: 光遗传学技术利用光敏元件对光的响应实现对目标的定时和定位调控, 具有无创、可控和响应快速等优势。利用基因编码蛋白质系统, 光遗传学能够对肿瘤发生和进展中的关键蛋白质进行光控调节, 从而为肿瘤治疗提供了一种新策略。基于此, 本文介绍了光遗传学技术的基本元件与应用形式, 综述了近年来光遗传学技术在肿瘤治疗领域的研究进展, 以期对光遗传学技术的应用以及向临床实践的转化探索新思路。

关键词: 光遗传学; 光敏元件; 肿瘤治疗

Optogenetics as a new strategy for tumor therapy

WEI Suyun, MU Weiwei, LIU Yongjun*, ZHANG Na*

(Key Laboratory of Chemical Biology Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

Abstract: Optogenetics technology uses the response of photosensitive elements to light to realize the target timing and positioning regulation, which has the advantages of non-invasive, controllable, and fast response. Using the gene coding system, optogenetics can photoregulate the key proteins in the occurrence and progression of tumors, thus providing a new strategy for tumor therapy. Based on this, this paper introduces the basic components and application forms of optogenetics technology, and reviews the research progress of optogenetics technology in the field of tumor therapy in recent years, in order to explore new ideas for the application of optogenetics technology and its transformation into clinical practice.

Key Words: optogenetics; photosensitive elements; tumor therapy

光遗传学(optogenetics)技术最初通过光控离子通道的开放和关闭用于实现神经元的控制, 而后随着这项技术的发展, 其概念扩展到任何旨在完成特定光介导任务的基因编码蛋白质系统^[1]。光遗传系统的构建以光敏蛋白为基础, 其基本特点是可以响应特定波长的光而发生构象变化, 从而在时间和空间维度实现信号转导的精准动态调控^[2]。作为这项技术的重要媒介, 光

具有可控、入侵性小、与生命系统高度兼容的特点, 在体内应用中具有良好的前景^[3]。基于以上优势, 光遗传学技术通过精确地调节基因和细胞的活性, 为肿瘤治疗领域开辟了新的可能性^[4]。基于光遗传学技术的基本原理, 本文介绍了光敏蛋白分类和光敏蛋白基因递送载体, 并对近年来光遗传技术在肿瘤治疗领域的应用与探索进行概述。

收稿日期: 2023-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(82173756); 国家自然科学基金青年基金(82204295); 山东省优秀青年基金项目(ZR2022YQ76)

第一作者: E-mail: wsususuy@163.com

*通信作者: 刘永军, E-mail: liuyongjun@sdu.edu.cn; 张娜, E-mail: zhangnancy9@sdu.edu.cn

1 光敏蛋白及其作用方式

光遗传学起源于Deisseroth及其同事对光敏蛋白通道视紫红质2(channel rhodopsin 2, ChR2)的创新性应用,这一应用实现了在时空水平精确控制神经元细胞的活性,引发了学者们研究光敏蛋白的兴趣^[5]。光敏蛋白是结构、构象和活性对光敏感的一类蛋白质的总称,通过吸收光子驱动光化学反应引起构象变化而完成光遗传学操控,是光遗传学技术的基本元件之一。目前广泛研究的光敏蛋白体系按照其光控结构的组成可以分为以下几类:单体体系、异二聚体系和寡聚体系等(表1)。

1.1 单体体系

光敏蛋白单体体系中的单个蛋白质同时具有光响应域和效应结构域^[2]。其中应用较广的有光-氧-电压结构域蛋白(light-oxygen-voltage domain, LOV)、通道视紫红质(channel rhodopsin, ChR)等。LOV结构域的光学活性来自与之非共价结合的黄素发色团,如黄素单核苷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸^[6,7]。当暴露于蓝光(450 nm)时,该发色团吸收蓝光引起LOV结构中C端J α 螺旋从PER-ARNT-SIM(PAS)核心脱离,进而实现光控信号传递^[8]。以微生物视蛋白家族蛋白质ChR为代表的光响应离子通道蛋白是光遗传学的重要研究内容之一^[9]。ChR2是最早和最广泛使用的微生物视紫红质,是一种光控非选择性阳离子通道蛋白,在420 nm蓝光刺激下可介导Na⁺、K⁺、H⁺、Ca²⁺以及其他阳离子跨膜内流,引起神经元的去极化和激活,广泛用于神经元回路的分析和功能表征^[10]。光敏蛋白单体体系结构简单,易于应用,是研究多聚体系的基础,发展潜力巨大。

1.2 异二聚体系

光诱导异二聚体系提供了更广泛的光波长选择,拓展了光遗传系统的应用范围。例如,光敏色素(phytochrome, Phy)能够响应具有更高穿透深度的红光和近红外光,基于光敏色素B的PhyB/PIF二聚系统是哺乳动物细胞中基因表达常用的光遗传学系统之一^[7]。PhyB的N端结构域构成光响应域并结合外源发色团藻蓝胆素,在650 nm红光作用下由非活性形式PhyB_R转变为活性形式PhyB_{FR},进而与光敏色素相互作用因子(phytochrome-interacting

factors, PIFs)结合;当PhyB_{FR}形式吸收远红光(740 nm)或恢复黑暗状态时,它会还原为PhyB_R形式而终止蛋白相互作用^[11]。基于这一特点,可以将目标蛋白融合到PhyB或PIF上,从而实现光控下的蛋白迁移或结合。该系统已被用于将PIF标记的蛋白质募集到亚细胞结构中,例如质膜、细胞核和过氧化物酶体等^[12]。常用的二聚体系还有在蓝光和黑暗中进行结合与解离的CRY2/CIB系统^[13]、由LOV结构域衍生的AsLOV2-SsrA/SspB系统^[14]、AsLOV2-ZdK系统^[15]等。与单体体系相比,异二聚体系由于其组分的多样性而被广泛研究,通过蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA或蛋白质-脂质相互作用实现快速有效的光遗传学控制。

1.3 寡聚体系

部分光敏蛋白在光照下发生同源寡聚体系与单体间的转变,如紫外光受体UVR8(UV resistance locus 8)、隐花色素(cryptochromes, CRYs)、荧光蛋白Dronpa等。UVR8利用色氨酸残基感知紫外光,无紫外光时为二聚体,在280~320 nm紫外光下二聚体间的静电相互作用被破坏而瞬间解离。解离的单体可以在紫外光照下与E3泛素连接酶相互作用以传递信号^[16]。CRYs是一种蓝光响应性蛋白,暴露于蓝光时,单体无活性CRYs发生磷酸化和寡聚化,参与多种信号蛋白的光诱导相互作用,CRY2的光控寡聚化和异二聚化广泛用于光遗传学应用^[17]。类似地,光敏蛋白Dronpa分别在488 nm蓝光和405 nm紫光下发生解离和同源寡聚化,并由于其荧光特性而用于蛋白质追踪研究^[18]。机体内许多信号转导受体和效应器需要经历寡聚化而激活下游信号,因此,基于光控寡聚体系的光遗传学系统是调节此种生命活动的重要工具,发展潜力较大^[9]。

2 光敏蛋白基因递送载体

2020年,Sébastien Tremblay联合全球52个实验室整合光遗传技术在非人灵长类动物实验中的数据成果,并形成了光遗传学开放数据库(<https://osf.io/mknfu/>),其发表在《Neuron》的文章表示大多数递送方案使用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为载体,其中AAV5血清型应用最广,占比36%,其次是AAV9(13%);慢病毒和犬腺

表 1 常用光敏蛋白体系

分类	组成	响应光波长	光控方式	参考文献
单体体系	LOV	450~500 nm	光诱导J α 螺旋脱离PAS结构域	[8]
	ChR2	450 nm	光控离子通道开放	[9]
	BphS	680~810 nm	光催化GTP转化为c-di-GMP	[19]
异二聚体系	PhyB-PIF	650 nm	PhyB响应光照发生构象变化而与PIF结合	[9]
	CRY2-CIB	450 nm	响应光照发生构象变化	[13]
	AsLOV2-SsrA/SspB	450~500 nm	光诱导J α 螺旋解旋使SsrA与SspB结合	[14]
	nMag-pMag	488 nm	光下利用静电作用二聚	[20]
寡聚体系	UVR8	280~320 nm	光控二聚体解离为单体	[16]
	CRY2	450 nm	光诱导黄素发色团结合腔松动, 触发CRY2寡聚	[17]
	Dronpa	488/405 nm	光控解离/寡聚化	[18]
	EL222	450 nm	光触发螺旋-转-螺旋结构域解开并介导二聚化	[21]

病毒2型各占比7%和3%^[22]。基于病毒载体的递送是临床前研究广泛使用的递送光敏蛋白基因的方法^[23]。重组AAV载体系统(rAAV)去除了天然AAV的*rep*和*cap*基因, 在细胞内复制和进一步感染的风险小^[24]。Zhou等^[25]利用光敏蛋白PhyA和FHY1在红光(660 nm)下相互作用的特点设计了一种光控REDMAP系统, 红光下, Δ PhyA-Gal4结构招募FHY1-VP64模块并易位至细胞核内, 与特异性启动子结合后启动转基因表达。截短的 Δ PhyA蛋白尺寸小, 能够通过AAV载体高效递送, 并在红光下调节基因表达。rAAVs的低整合率使宿主基因组所受的影响最小化, 但也因此不适合用于在靶细胞中持续进行基因表达。与AAV相比, 慢病毒载体能够将外源基因整合至宿主基因组而实现生物体或细胞内稳定的转基因表达^[26]。Ueda等^[27]开发了一种控制磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)信号转导的光遗传学工具(PPAP2), 将PPAP2基因插入pCS2慢病毒载体并递送至细胞内, 稳定表达PPAP2的黑色素瘤细胞在过度激活状态下获得对抗癌药物达卡巴嗪的耐药性, 用于研究PI3K信号过度激活状态时的癌变行为。

目前, 已上市的基因治疗药物多数利用病毒载体递送目的基因。但应用病毒载体存在一定的风险, 如插入诱变、免疫反应和表观遗传沉默等^[28]。与之相比, 非病毒载体(如脂质纳米颗粒、聚合物材料和生物材料等)相对安全, 宿主免疫原

性低且制备成本低, 发展潜力较大。Hsieh等^[29]将编码细菌视紫红质蛋白的质粒和自修复壳聚糖水凝胶共注射至成年小鼠神经干细胞内, 达到了80%的转染效率, 并在斑马鱼中枢神经系统缺陷模型中实现了绿光激活的神经功能的修复。通过不断改善材料及递送方法来提高转染效率, 非病毒载体或许可以成为基因递送中的重要工具。总之, 随着基因递送领域的技术与理念不断创新, 更具潜力的递送方式将对光遗传技术的发展产生重大影响。

3 光遗传技术在肿瘤治疗领域的应用与探索

据统计, 2020年, 全球癌症新发病例约有两千万, 死亡病例高达一千万, 癌症已成为大多数国家排名前列的死亡原因^[30]。目前已有多种肿瘤治疗方法, 如手术、化疗、放疗、生物治疗等, 但大多数疗法都会对机体正常细胞或组织造成损伤^[31]。相比以上疗法引起的不良反应, 光遗传学由于其精确的时空控制和更小的脱靶毒性为肿瘤治疗开辟了新的领域。

3.1 光诱导基因组编辑工具

基因编辑通过设计特定的蛋白质或蛋白质-RNA复合物“靶向”单个基因或非编码区域的特定DNA序列, 引发单链或双链DNA断裂, 进而利用细胞内DNA修复机制引入突变, 达到基因治疗的目的^[37]。

由Cas9蛋白及sgRNA两种组分构成的CRISPR-Cas9系统由于其简单性成为应用最广泛的基因编辑工具,但CRISPR-Cas9系统仍存在时空特异性有限和脱靶效应等缺陷^[38]。已有研究将光遗传学技术与CRISPR-Cas9基因编辑技术结合以克服以上问题。Chen等^[32]开发了一种光激活的CRISPR-Cas9纳米系统,利用阳离子聚合物包被的金纳米棒(Au nanorod, APC)递送热诱导启动子HSP70驱动的Cas9质粒并在细胞内将光转化为局部热量,触发Cas9和sgRNA的转录。APC作为光遗传学开关特异地调节Cas9的表达和活性,并显著减少了脱靶效应(图1A)。另一种有效方法是,使用光诱导二聚体从分裂的两部分中重建Cas9蛋白。Yu等^[39]报告了一种远红光激活的split-Cas9(FAST)系统,将Cas9的两个片段分别与蛋白Coh2、DocS融合,融合蛋白的表达由远红光照射环状二鸟苷酸单磷酸(c-di-GMP)合酶(BphS)激活后启动,利用Coh2与DocS的结合实现光控Cas9的重建,并在人肺癌A549异种移植肿瘤小鼠中验证了该FAST系统的肿瘤抑制作用。

3.2 光诱导细胞程序性死亡

细胞程序性死亡能够调节免疫抑制肿瘤微环境并影响癌症治疗方法的临床效果,常分为凋亡、坏死性凋亡和焦亡等方式^[19]。与化学诱导或激光诱导细胞死亡相比,光照能够提供迅速的信号传递,可通过改变光照条件来精确控制细胞死亡,还能够将细胞死亡诱导限制在目标细胞或组织,应用潜力巨大^[40]。He等^[33]将坏死性凋亡的执行蛋白MLKL与光学多聚体CRY2融合,构建了光遗传坏死性凋亡系统LiPOP1。该系统越过坏死性凋亡途径的RIPK1、RIPK3等上游调节因子,通过直接光照激活MLKL蛋白而引发宫颈癌异种移植小鼠模型中肿瘤消退,实现了坏死性凋亡的光遗传学控制(图1B)。Shkarina等^[41]提出了一种光遗传控制的细胞死亡效应器(optoCDEs),通过将蓝光(450~488 nm)响应寡聚化模块Cry2olig融合到人、小鼠或斑马鱼炎性半胱天冬酶的效应域,设计了光激活半胱天冬蛋白酶(optoCaspsaes),可在光照后几分钟内诱导快速有效的焦亡。

3.3 光控免疫细胞工程

截至2022年4月15日,全球免疫肿瘤学管线中

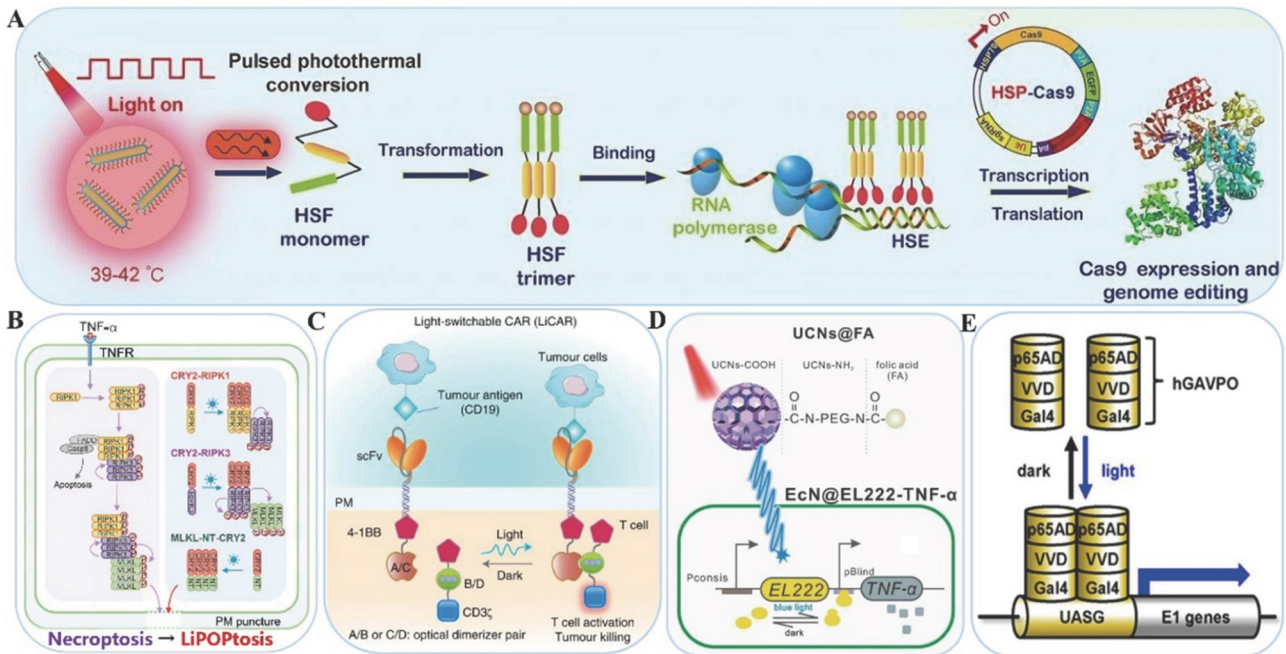
在研活性细胞疗法药物数目较2021年增长36%,其中嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)疗法药物在各个类别中占比最多,显示细胞疗法良好的应用前景^[42]。然而,由于缺乏对抗肿瘤免疫应答的位置和持续时间的精确控制,CAR-T细胞疗法在应用过程中仍存在一些重大安全性挑战,如靶向非肿瘤毒性等^[43]。

结合光遗传技术可以在一定程度上避免基于CAR-T细胞的免疫疗法引起的安全问题,利用无线光调控激活治疗性免疫细胞,从而实现在肿瘤微环境中的个性化治疗^[44]。在光控CAR-T细胞疗法中,光学二聚体系应用较为广泛。Nguyen等^[34]采用CRY2-CIB1与LOV-ssrA/sspB两种光学二聚体构建了光控CAR-T系统,该系统将CAR的功能域分裂为细胞内外两部分,并将光学二聚体分别构建在每一部分中。蓝光激发光学二聚体的形成,进而招募CD3 ζ 结构域形成一个完整的功能性嵌合抗原受体,实现了光控识别与杀伤肿瘤细胞(图1C)。类似地,Huang等^[13]将CRY2-CIB1二聚体系与基于LOV2的光诱导核定位信号NLS相结合,通过蓝光诱导核定位信号暴露,使核外表达的CIB1易位至细胞核并完成二聚化,进而实现融合蛋白的结合,触发报告基因的表达。He等^[21]将光学二聚体(ssrA-cpLOV2及sspB)制成的光响应模块分别融合到基本组件(scFv-铰链-TM-CD28-4-1BB和4-1BB-CD3 ζ)上,这些组件在二聚化时构成完整的CAR结构,成功表现出近红外光激活的抗淋巴瘤活性。

3.4 光控工程菌

在癌症治疗中,自发靶向实体瘤的厌氧菌被广泛用于靶向抗肿瘤药物递送,这类细菌及其产品又被称为活体生物治疗产品(LBP)^[45,46]。在现有的LBPs治疗中,尽管细菌可以靶向肿瘤部位,但体内治疗可控性不足,光作为一种安全可控的外源性诱导剂可被用于解决这种问题^[35]。

光控工程菌的设计大多基于上转换光遗传学策略,同时递送上转换纳米颗粒(UCNP)和光控表达异源基因的工程菌株,从而利用穿透性强的红光实现目的基因的光控体内表达。研究人员以乳酸乳球菌(*L. lactis*)、大肠杆菌Nissle 1917(EcN)等细菌为载体,利用pDawn蓝光响应质粒系统和蓝光敏



A: APC作为光遗传学开关特异地调节Cas9的表达^[32](已获PNAS版权使用许可); B: 光遗传坏死性凋亡系统LiPOPT^[33](已获John Wiley and Sons版权使用许可); C: 由肿瘤抗原(CD19)和光双重门控的光活化CAR-T系统^[34](已获Springer Nature版权使用许可); D: EcN@EL222-TNF α 工程菌株实现小鼠体内TNF α 的光控表达^[35](已获Elsevier版权使用许可); E: 蓝光活化的溶瘤腺病毒引发肿瘤部位细胞病变^[36](已获Springer Nature版权使用许可)

图1 光遗传技术在肿瘤治疗领域的应用形式

感的EL222启动子构建了工程菌株LL-pDawn-IFN- γ ^[47]、EcN@EL222-TNF α ^[35](图1D)、EcN-pDawn- ϕ x174E/TRAIL^[20]和EcN-pET20b-EL222-flaB-mCherry^[48]等,在荷瘤小鼠体内实现了光控 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)和鞭毛蛋白B(flacB)的表达,验证了光控工程菌在体内治疗肿瘤的可控性和有效性。以上基于上转换光遗传学的策略提高了工程LBP的抗肿瘤可控性和生物相容性,在应用LBP治疗各种疾病方面具有广阔的前景。

3.5 光活化溶瘤病毒

溶瘤病毒疗法是一种极具发展潜力的抗癌免疫疗法,它利用某些具有复制能力的病毒,在保留非肿瘤细胞完整性的同时感染和优先溶解肿瘤细胞,但这一疗法存在安全性和治疗特异性不足等缺陷^[49]。近年来,光控疗法的发展为溶瘤病毒的研究提供了新思路。Tahara等^[50]提出了一种单胞菌病毒基因表达和复制的时空控制系统,利用光控

Magnet系统调控L蛋白聚合酶的活性,在人乳腺癌异种移植小鼠模型中实现了蓝光激活的病毒复制和溶瘤活性的增强。为了增强溶瘤腺病毒的肿瘤选择性,Hagihara等^[36]开发了一种可光活化的溶瘤腺病毒(paOAd)用作安全有效的抗癌剂。研究人员结合光敏转录因子GAVPO及腺病毒复制所必需的E1A和E1B19k基因,蓝光照射下,GAVPO发生同源二聚化,使转录激活蛋白Gal4结合基因启动子的上游激活序列UASG,从而诱导E1A和E1B19k的表达,实现了paOAd以蓝光照射依赖的方式引发肿瘤部位细胞病变(图1E)。

4 总结与展望

光遗传学技术的发展为肿瘤治疗中的难题提供了一种光控解决方法,联合这一技术使基因疗法、细胞疗法等更加安全、精准、有效。该技术近年来发展迅速,但也面临一些挑战:首先,光照对机体正常组织具有一定影响,虽然光照具有非侵入性,但持续的光照会影响细胞活力、触发氧化应激反应等,因此光照的波长、功率密度、

频率及光照时间等因素需进一步考察^[16]。其次, 现有光敏蛋白体系的主要成分均来自非人类物种, 引入人体后可能引发细胞毒性或免疫反应等危害, 且现有的光敏蛋白体系大多依赖蓝光, 穿透性差导致治疗效果不足, 因此高效低毒的光敏蛋白体系有待开发^[7]。总之, 随着光遗传学技术在肿瘤治疗领域不断开拓新的研究方向, 这一手段将有望加速个性化治疗的发展, 为临床治疗方案提供更多选择。

参考文献

- [1] Wittmann T, Dema A, van Haren J. Lights, cytoskeleton, action: optogenetic control of cell dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 66: 1-10
- [2] Kichuk TC, Carrasco-López C, Avalos JL. Lights up on organelles: optogenetic tools to control subcellular structure and organization. *WIREs Mech Dis*, 2021, 13(1): e1500
- [3] Chia N, Lee SY, Tong Y. Optogenetic tools for microbial synthetic biology. *Biotechnol Adv*, 2022, 59: 107953
- [4] Malogolovkin A, Egorov AD, Karabelsky A, et al. Optogenetic technologies in translational cancer research. *Biotechnol Adv*, 2022, 60: 108005
- [5] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, 8(9): 1263-1268
- [6] Hongdusit A, Liechty ET, Fox JM. Optogenetic interrogation and control of cell signaling. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66: 195-206
- [7] Wichert N, Witt M, Blume C, et al. Clinical applicability of optogenetic gene regulation. *Biotech Bioeng*, 2021, 118(11): 4168-4185
- [8] Huang P, Zhao Z, Duan L. Optogenetic activation of intracellular signaling based on light-inducible protein-protein homo-interactions. *Neural Regen Res*, 2022, 17(1): 25-30
- [9] Repina NA, Rosenbloom A, Mukherjee A, et al. At light speed: advances in optogenetic systems for regulating cell signaling and behavior. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2017, 8(1): 13-39
- [10] Zhang H, Fang H, Liu D, et al. Applications and challenges of rhodopsin-based optogenetics in biomedicine. *Front Neurosci*, 2022, 16: 966772
- [11] Müller K, Engesser R, Metzger S, et al. A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): e77-e77
- [12] Yang X, Jost APT, Weiner OD, et al. A light-inducible organelle-targeting system for dynamically activating and inactivating signaling in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(15): 2419-2430
- [13] Huang Z, Wu Y, Allen ME, et al. Engineering light-controllable CAR T cells for cancer immunotherapy. *Sci Adv*, 2020, 6(8): eaay9209
- [14] Guntas G, Hallett RA, Zimmerman SP, et al. Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(1): 112-117
- [15] Wang H, Vilela M, Winkler A, et al. LOVTRAP: an optogenetic system for photoinduced protein dissociation. *Nat Methods*, 2016, 13(9): 755-758
- [16] Tan P, He L, Huang Y, et al. Optophysiology: Illuminating cell physiology with optogenetics. *Physiol Rev*, 2022, 102(3): 1263-1325
- [17] Ma L, Guan Z, Wang Q, et al. Structural insights into the photoactivation of *Arabidopsis* CRY2. *Nat Plants*, 2020, 6(12): 1432-1438
- [18] Andresen M, Stiel AC, Trowitzsch S, et al. Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(32): 13005-13009
- [19] Liu J, Hong M, Li Y, et al. Programmed cell death tunes tumor immunity. *Front Immunol*, 2022, 13: 847345
- [20] Zhang Y, Xue X, Fang M, et al. Upconversion optogenetic engineered bacteria system for time-resolved imaging diagnosis and light-controlled cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(41): 46351-46361
- [21] He L, Tan P, Zhu L, et al. Circularly permuted LOV2 as a modular photoswitch for optogenetic engineering. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(8): 915-923
- [22] Tremblay S, Acker L, Afraz A, et al. An open resource for non-human primate optogenetics. *Neuron*, 2020, 108(6): 1075-1090.e6
- [23] Xu X, Mee T, Jia X. New era of optogenetics: from the central to peripheral nervous system. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020, 55(1): 1-16
- [24] Bedbrook CN, Deverman BE, Gradinaru V. Viral strategies for targeting the central and peripheral nervous systems. *Annu Rev Neurosci*, 2018, 41(1): 323-348
- [25] Zhou Y, Kong D, Wang X, et al. A small and highly sensitive red/far-red optogenetic switch for applications in mammals. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(2): 262-272
- [26] Parr-Brownlie LC, Bosch-Bouju C, Schoderboeck L, et al. Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 14
- [27] Ueda Y, Miura Y, Tomishige N, et al. Mechanistic insights into cancer drug resistance through optogenetic PI3K signaling hyperactivation. *Cell Chem Biol*, 2022, 29

- (11): 1576-1587
- [28] Picanço-Castro V, Pereira CG, Covas DT, et al. Emerging patent landscape for non-viral vectors used for gene therapy. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(2): 151-157
- [29] Hsieh FY, Han HW, Chen XR, et al. Non-viral delivery of an optogenetic tool into cells with self-healing hydrogel. *Biomaterials*, 2018, 174: 31-40
- [30] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249
- [31] Alizadeh S, Esmaili A, Barar J, et al. Optogenetics: A new tool for cancer investigation and treatment. *Bioim-pacts*, 2022, 12(4): 295-299
- [32] Chen X, Chen Y, Xin H, et al. Near-infrared optogenetic engineering of photothermal nanoCRISPR for program-mable genome editing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(5): 2395-2405
- [33] He L, Huang Z, Huang K, et al. Optogenetic control of non-apoptotic cell death. *Adv Sci*, 2021, 8(13): 2100424
- [34] Nguyen NT, Huang K, Zeng H, et al. Nano-optogenetic engineering of CAR T cells for precision immunotherapy with enhanced safety. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(12): 1424-1434
- [35] Pan H, Li L, Pang G, et al. Engineered NIR light-responsive bacteria as anti-tumor agent for targeted and precise cancer therapy. *Chem Eng J*, 2021, 426: 130842
- [36] Hagihara Y, Sakamoto A, Tokuda T, et al. Photoactiva-table oncolytic adenovirus for optogenetic cancer therapy. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 570
- [37] Ormond KE, Mortlock DP, Scholes DT, et al. Human germline genome editing. *Am J Hum Genet*, 2017, 101(2): 167-176
- [38] Mathony J, Hoffmann MD, Niopek D. Optogenetics and CRISPR: A new relationship built to last. *Methods Mol Biol*, 2020, 2173: 261-281
- [39] Yu Y, Wu X, Guan N, et al. Engineering a far-red light-activated split-Cas9 system for remote-controlled genome editing of internal organs and tumors. *Sci Adv*, 2020, 6(28): eabb1777
- [40] Tait SWG. Killing cells using light (activated) sabers. *J Cell Biol*, 2022, 221(6): e202205018
- [41] Shkarina K, Hasel de Carvalho E, Santos JC, et al. Optogenetic activators of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. *J Cell Biol*, 2022, 221(6): e202109038
- [42] Saez-Ibañez AR, Upadhaya S, Partridge T, et al. Land-scape of cancer cell therapies: trends and real-world data. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(9): 631-632
- [43] Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4): 69
- [44] Huang K, Liu X, Han G, et al. Nano-optogenetic immunotherapy. *Clin Transl Med*, 2022, 12(9): e1020
- [45] Charbonneau MR, Isabella VM, Li N, et al. Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1738
- [46] Yu X, Lin C, Yu J, et al. Bioengineered *Escherichia coli* Nissle 1917 for tumour-targeting therapy. *Microb Bio-technol*, 2020, 13(3): 629-636
- [47] Yang C, Cui M, Zhang Y, et al. Upconversion optogenetic micro-nanosystem optically controls the secretion of light-responsive bacteria for systemic immunity regulation. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 561
- [48] Zhu X, Chen S, Hu X, et al. Near-infrared nano-optogenetic activation of cancer immunotherapy via engineered bacteria. *Adv Mater*, 2023, 35(8): e2207198
- [49] Shalhout SZ, Miller DM, Emerick KS, et al. Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(3): 160-177
- [50] Tahara M, Takishima Y, Miyamoto S, et al. Photocontrol-able mononegaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(24): 11587-11589